

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
27 juin 2002 (27.06.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 02/50550 A2**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
G01N 33/92, C07K 14/47, 16/00, A61M 1/36

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/EP01/15279

(22) Date de dépôt international :  
21 décembre 2001 (21.12.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
2000/0807 21 décembre 2000 (21.12.2000) BE

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
HENOGEN S.A. [BE/BE]; Rue des Professeurs Jeener et  
Brochet 12, B-6041 Charleroi (BE).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : BOLLEN,  
Alex [BE/BE]; Gaasbeekstraat 65, B-Bruxelles (BE).  
MOGUILEVSKY, Nicole [FR/BE]; Rue Kelle 129,  
B-Bruxelles (BE). CARPENTIER, Yvon [BE/BE]; Rue  
du Perche 110, B-1180 Bruxelles (BE). DUCOBU, Jean  
[BE/BE]; Rue de Beaulieu 101, B-7021 Havré (BE).

(74) Mandataire : COLENS, Alain; c/o Bureau Colens SPRL,  
Rue Franz Merjay 21, B-1050 Bruxelles (BE).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,  
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,  
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,  
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,  
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ,  
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG).

**Publiée :**

- sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport
- avec une (des) indication(s) relative(s) à du matériel bi-  
ologique déposé, fournie(s) selon la règle 13bis, séparé-  
ment, et non avec la description

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abrégiactions" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: OXIDISED LOW-DENSITY LIPOPROTEINS (LDL) FRACTIONS, CORRESPONDING ANTIBODIES, METHOD  
FOR OBTAINING SAME AND DIAGNOSTIC OR THERAPEUTIC USE

(54) Titre : FRACTIONS DE LDL OXYDEES, ANTICORPS CORRESPONDANTS, PROCEDE D'OBTENTION ET UTILISA-  
TION A BUT DIAGNOSTIQUE OU THERAPEUTIQUE

(57) Abstract: The invention concerns the use of myeloperoxydases for obtaining oxidised lipoproteins and corresponding mono-  
clonal antibodies. Various fractions of oxidised LDL are isolated and novel monoclonal antibodies are obtained from said fractions.  
Said antibodies are suitable for diagnostic, preventive or therapeutic use. Several productive lines of said antibodies have also been  
isolated and characterised. The invention also concerns tests and related kits for diagnosing and determining cardiovascular risk.

(57) Abrégé : L'invention concerne l'utilisation de myéloperoxydases pour l'obtention de lipoprotéines oxydées et des anticorps  
monoclonaux correspondants. Différentes fractions de LDL oxydées sont isolées et de nouveaux anticorps monoclonaux sont obte-  
nus à partir de ces fractions. Ces anticorps sont aptes à être utilisés dans un but diagnostique, préventif ou thérapeutique. Plusieurs  
lignées productrices de ces anticorps ont également été isolées et caractérisées. L'invention propose aussi des tests et des kits associés  
pour le diagnostic et la détermination du risque cardiovasculaire.

WO 02/50550 A2

Fractions de LDL oxydées, anticorps correspondants,  
procédé d'obtention et utilisation à but  
diagnostique ou thérapeutique

5

La présente invention concerne l'utilisation de  
myéloperoxydases pour l'obtention de lipoprotéines oxydées  
et des anticorps monoclonaux correspondants, les fractions  
de LDL oxydées et les nouveaux anticorps monoclonaux  
10 obtenus à partir de ces fractions, les lignées  
productrices de ces anticorps, l'utilisation diagnostique  
et thérapeutique de ces anticorps et lignées, en  
particulier un test diagnostique pour la détermination du  
risque cardio-vasculaire ainsi que des kits d'application  
15 diagnostique.

La myéloperoxydase (MPO) est une enzyme présente dans les  
neutrophiles et monocytes, apte à catalyser les réactions  
20 d'oxydation dans l'espace sous-endothélial. Il est bien  
connu que cette oxydation fait intervenir, à partir de  
peroxyde d'hydrogène, l'acide hypochloreux produit en  
présence de la MPO et de chlorure.

25 Par ailleurs on sait que les lipoprotéines de faible  
densité (Low Density Lipoprotein, LDL), sous forme  
oxydées, sont impliquées dans certaines affections  
cardiovasculaires, en particulier l'athérosclérose. On a  
ainsi rapporté la présence de LDL modifiées par l'acide  
30 hypochloreux dans des lésions athéromateuses.

Le test basé sur ces lipoprotéines actuellement utilisé  
pour définir la propension d'un patient donné à développer  
des maladies cardiovasculaires fait appel à un agent  
35 pro-oxydant très puissant et non physiologique, le sulfate

de cuivre ( $\text{CuSO}_4$ ). Ce test est toutefois peu précis et se déroule dans des conditions très éloignées des conditions in vivo.

5 De nombreuses autres méthodes de diagnostic et d'analyse se basant sur les produits d'oxydation des LDL ont été divulguées. On peut citer à titre d'exemple les documents de brevet 5.874.313, WO 98/21581, WO 99/08109, WO 98/12561 et WO 98/10294. Ce dernier document propose une  
10 méthode diagnostique basée sur la mesure de la concentration en 3-chlorotyrosine dans les liquides biologiques et les tissus, cette substance étant produite spécifiquement par le système MPO/Cl/ $\text{H}_2\text{O}_2$ . On mentionne dans ce document que la mesure peut éventuellement être  
15 menée par immunoessai à l'aide d'anticorps produits contre la 3-chlorotyrosine.

Le document de brevet WO 98/59248 (PCT/BE98/59248)2 divulgue un procédé d'immuno-détection de LDL oxydées et  
20 modifiées par la malondialdéhyde (MDA) et des anticorps associés. L'oxydation ne simule cependant pas de manière optimale le processus naturel.

Un des buts de la présente invention est de proposer un  
25 test diagnostique capable de mesurer des paramètres permettant une détection plus précise et plus précoce des patients à risque, en se référant à un processus oxydatif des LDL survenant in vivo.

30 La mise au point de ce test a fait intervenir une myéloperoxydase. On peut en particulier utiliser une myéloperoxydase recombinante humaine aux propriétés identiques à celles de la myéloperoxydase naturelle.

35 La présente invention propose également des anticorps

monoclonaux, ainsi que les hybridomes correspondants, capables de reconnaître des fractions spécifiques de lipoprotéines oxydées par l'acide hypochloreux, par exemple en présence de myéloperoxydase, et donc d'être  
5 utilisés pour l'immunodétection et le dosage de ces lipoprotéines oxydées. Pareil dosage peut avantageusement refléter un facteur de risque cardio-vasculaire.

Selon un aspect de l'invention, on propose de manière  
10 générale un test pour la détermination du risque cardio-vasculaire d'un patient comprenant les étapes suivantes qui seront explicitées ultérieurement :

- fixation d'un anticorps monoclonal anti-fraction B sur une plaque
- 15 - extraction des LDL oxydées du plasma par adsorption sur l'anticorps monoclonal
- reconnaissance des LDL fixées à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-apoB
- révélation par un marqueur qui peut être par exemple  
20 une peroxydase couplée à l'anticorps polyclonal ou un anticorps de détection, p.e. si l'anticorps polyclonal antiapo-B est un anticorps de lapin, un anticorps de chèvre anti-IgG(Fc) de lapin couplé à la phosphatase alcaline
- 25 - détermination de la concentration en LDLox.

Selon un autre aspect de l'invention, on a constaté que la vitesse d'oxydation des LDL d'un patient donné constitue une méthode prometteuse pour définir la propension de ce  
30 patient donné à développer des maladies cardiovasculaires. Comme déjà évoqué, un des principaux facteurs intervenant à un stade précoce dans la formation de la lésion d'athéromatose est la peroxydation des LDL. Comme les LDL oxydées (oxLDL) sont très rapidement captées par les  
35 macrophages de la paroi artérielle, la mesure de leur

concentration seule pourrait n'être pas représentative de leur production in vivo. Par contre, la susceptibilité des LDL, d'un sujet donné à subir des dommages peroxydatifs peut être évaluée par un test in-vitro.

5

Selon encore un autre aspect de l'invention on propose un test basé sur la détection d'autoanticorps naturels dans le plasma, dirigés contre des LDL oxydées naturellement par la myéloperoxydase

10

Selon encore un autre aspect de l'invention, on propose une méthode de traitement immunothérapeutique consistant à traiter le sang d'un patient pour en retirer les antigènes LDL oxydées. Cette méthode consiste à faire passer le sang, ou une fraction de sang, d'un patient dans un système où il entrera en contact avec des anticorps anti-fraction B immobilisés par une fraction B de LDL oxydée, par exemple sur une colonne d'immunoabsorption, avant d'être retourné au patient, le sang ou la fraction de sang étant au moins partiellement débarrassé desdites LDL oxydées.

15

20

#### DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

25

L'invention est décrite plus en détail en se référant à des modes particuliers de réalisation décrits ci-après et aux figures annexées à titre d'exemple non-limitatifs.

30

Dans ces annexes,

- la Fig. 1 est un chromatogramme de LDL oxydée selon l'invention montrant la séparation des sous-fractions B, C, D,

35

- la Fig. 2 représente un graphique des concentrations en sous-fractions en fonction du temps d'oxydation,

- - la Fig. 3 illustre la reconnaissance de la sous-fraction B par 3 anticorps monoclonaux selon l'invention,
- 5 - - les Figs. 4a à 4c illustrent la spécificité des anticorps vis à vis des épitopes reconnus, au moyen de test ELISA de compétition,
- - la Fig. 5 illustre les résultats de test ELISA sandwich de mesure de LDL oxydées circulantes pour 13 patients et un témoin négatif,
- 10 - - la Fig. 6 est un schéma illustrant la procédure pour un test de mesure de sensibilité à l'oxydation ex-vivo de LDL
- - la Fig. 7 illustre le résultat de tests selon la Fig. 6 pour 33 patients par rapport à une population
- 15 contrôle.

Un des buts de l'invention est de proposer des anticorps spécifiquement dirigés contre certaines sous-fractions de

20 LDL oxydées telles qu'elles sont générées dans les systèmes biologiques. Ces fractions de LDL oxydées peuvent être préparées par oxydation avec le système  $H_2O_2$ /chlorure générant l'acide hypochloreux en présence d'une myéloperoxydase.

25

On décrit ci-après l'obtention de myéloperoxydase, l'oxydation de LDL, la séparation des fractions obtenues, la production d'hybridomes et la production d'anticorps

30 spécifiques aux fractions oxydées, ainsi que l'utilisation de ces anticorps pour la détection et le dosage de LDL oxydée dans un but diagnostique ou thérapeutique.

### 1. Production de la myéloperoxydase

La myéloperoxydase peut être produite à partir du clone CHO producteur de la myéloperoxydase recombinante MPOR. Le  
5 clone qui a été utilisé dans le cadre de la présente invention est le clone 24-1-7-57 et a été mis en culture Opticell (Charles River). Dans ce système les cellules adhèrent à un support de céramique (Opticore) de 4.500  
10 cm<sup>2</sup> de surface et le milieu de culture est perfusé en continu. Plusieurs paramètres sont contrôlés en permanence: le pH, la température, la teneur en oxygène, en CO<sub>2</sub>, et la concentration en glucose.

Chaque jour, les concentrations du milieu en lactate et  
15 en glucose sont mesurées ainsi que l'activité peroxydasique due à la myéloperoxydase synthétisée et sécrétée dans le milieu.

La culture peut être maintenue pendant 2 mois. Le  
20 maximum de production se situe aux environs de 30 jours. Tous les 3 jours environ, l'entièreté du milieu de culture est récoltée, centrifugée et conservée.

Alternativement, les cellules peuvent être maintenues en  
25 culture en « cell factory », le surnageant de culture étant aussi récolté tous les 3 jours, et la culture pouvant être maintenue 2 mois.

Avant chaque purification, il est nécessaire de purifier  
30 les surnageants de culture afin d'en éliminer les débris cellulaires. A cette fin, un système de filtration composé d'une pompe péristaltique à haut débit (Watson Marlow 505 s) et d'un filtre tangentiel (Ultrasette, Filtron) ont été utilisés.

Cet appareillage permet la filtration et la concentration simultanées de surnageant de culture avant le dépôt sur la colonne. Après une concentration de 10 fois, le surnageant est dilué environ 2 fois jusqu'à  
5 atteindre la résistivité de 4mS/cm, équivalente à celle du tampon d'équilibrage de la colonne. Aucune perte en MPO n'a été détectée dans le filtrat analysé par Western blot, et par contre par ELISA, une perte d'environ 0,7% y a été relevée.

10 Ce système de filtration tangentielle s'avère donc extrêmement utile et fiable pour le traitement de grands volumes de surnageant de culture à purifier.

15 A chaque purification, environ 10 l de surnageant de culture filtrés, concentrés et équilibrés au niveau du pH et de la force ionique sont déposés sur une colonne de Q Sepharose Fast Flow (10 cm x 20 cm, 1570 ml de gel) équilibrée en tampon de phosphate 20 mM pH 7,5. Cette  
20 colonne échangeuse d'anions, retenant les contaminants - principalement les protéines sériques, est directement connectée à une colonne de CM-Sepharose (3,5 cm x 15 cm), échangeuse de cations sur laquelle la MPOR est retenue et est éluée à l'aide d'un Gradient de NaCl de 0 à 0,6 M  
25 (900 ml). La MPOR est décrochée à la concentration d'environ 0,28 M NaCl et sort sous forme d'un pic protéique unique. L'activité peroxydasique est parfaitement superposable au pic mesuré à 280 nm.

30 L'analyse de la pureté des fractions éluées a été réalisée par électrophorèse sur gel en conditions non réductrices et en présence de SDS. A la coloration au bleu de Coomassie, la NIPOR apparaît sous forme de 2  
bandes de 84 et 94 kDa. Cette seconde bande de 94 kDa est  
35 immunoréactive et correspond à une fraction mineure de la



MPO.

Les fractions ont été dosées pour la concentration en protéines (dosage de Lowry) et en activité peroxydasique (o-dianisidine comme substrat). La fraction la plus active correspond au sommet du pic d'élution et de chloration (avec le monchlorodimédon comme substrat).

Selon les analyses des sucres déjà effectuées, les deux bandes de 84 et 94 kDa correspondent à des formes de promPPO exposant des degrés de glycosylation différents. La bande de 84 kDa correspondrait majoritairement à la protéine exposant des chaînes glycosylées riche en mannose, tandis que la forme de 94 kDa présenterait des chaînes de glycosylation complexe, allant jusqu'à l'acide sialique.

A partir de 80 l de surnageant de culture, 370 mg de MPO pure ont été obtenus, soit environ 4,5 mg/l. La MPO recombinante apparaît sous forme de 2 bandes de 84 et 94 kDa, ayant la même séquence protéique, mais différant par la nature de leurs glycosylations.

## 2 Production de sous-fractions de LDL oxydées par la myéloperoxydase

Les altérations oxydatives pouvant survenir au niveau des LDL sont principalement de deux types, d'une part la peroxydation des lipides et d'autre part des modifications oxydatives au niveau de l'apoB. L'un des modèles utilisé le plus couramment pour déclencher une oxydation des LDL in vitro est basé sur l'utilisation du cuivre ( $\text{Cu}^{++}$ ) comme agent oxydant (Esterbauer et al.). Ce modèle évalue au cours du temps l'augmentation des produits de dégradation des composants lipidiques des LDL et renseigne

principalement sur le statut en antioxydant de ces lipoprotéines. Cependant, l'utilisation du  $\text{Cu}^{++}$  comme agent pro-oxydant reste très controversée étant donné que son implication au niveau des pathologies cardiovasculaires n'a pas été démontrée de façon formelle. Par contre, d'autres agents oxydants tels que l'acide hypochloreux, généré par la MPO, semble bien figurer parmi les principaux initiateurs de la formation des cellules spumeuses et donc dans le développement de plaques d'athéromes. En effet, l'implication de la MPO dans l'oxydation in vivo et dans la pathogénie des maladies cardio-vasculaires est fortement suggérée par la présence de MPO et de dérivés oxydés de la tyrosine, notamment la dityrosine ou encore la 3-chlorotyrosine, dans les lésions athéromateuses. La MPO utilise en fait le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) comme substrat pour oxyder les halogénures tels que les ions chlorure, permettant ainsi la formation d'acide hypochloreux, agent très toxique et microbicide. Il est important de noter que, contrairement au cas des ions métalliques, les dégâts oxydatifs engendrés par la MPO concernent principalement les protéines et particulièrement l'apoprotéine B dans le cas des LDL.

#### Conditions d'oxydation des LDL

Afin d'illustrer l'aspect de l'invention basé sur des altérations de LDL engendrées par la MPO, l'apport du substrat peroxyde d'hydrogène a été effectué suivant deux voies : production progressive de peroxyde d'hydrogène dérivant de la transformation du glucose par la glucose-oxydase d'une part, ajout direct de peroxyde d'hydrogène dans le milieu d'oxydation d'autre part.

Les conditions d'oxydation à la MPO sont les suivantes :

Système MPO/Glucose-oxydase

278 mg prot. LDL

5 40 U MPO (unités peroxidasiques, avec  
1'o-dianisine comme substrat)

90 min à 30°C

Système MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

10 1,6 mg protéine LDL

8 U MPO

1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

5 min à 37°C

15 La séparation des sous-fractions de LDL oxydées peut être  
effectuée en utilisant une chromatographie du type Fast  
Protein Liquid Chromatography (FPLC) avec une colonne  
échangeuse d'anions Mono Q. Les différentes sous-fractions  
de l'oxydation présentent en effet des charges  
20 électronegatives en fonction de leur degré d'altération.  
On a constaté que des fractions (A, B, C ... ) peuvent  
ainsi être éluées de la colonne en utilisant des tampons  
contenant des concentrations croissantes en NaCl.

25 Après optimisation des conditions d'élution, les  
coefficients de variation obtenus pour les différentes  
fractions de LDL oxydées ont montré une bonne  
reproductibilité de la technique utilisée (CV<5 % pour des  
pics majoritaires).

30

La Fig. 1 illustre l'excellente séparation des fractions  
oxydées B, C et D obtenues avec allongement des plateaux  
salins correspondant au passage des fractions.

Les résultats de FPLC montrent clairement que les dégâts oxydatifs liés à la MPO surviennent dans les 5 premières minutes quelque que soit le système oxydatif (glucose/ glucose oxydase ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

5

La Fig. 2 illustre la cinétique d'apparition des fractions oxydées avec le peroxyde d'hydrogène (MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pour des concentrations d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 179 µM. On constate qu'après 5 minutes, la réaction est pratiquement terminée.

10

#### Caractérisation des sous-fractions de LDL oxydées

##### Electrophorèse sur gel

Les électrophorèses pratiquées après un stress oxydatif montrent que les dégâts causés par le système MPO/Glucose-oxydase consistent surtout dans des fragmentations de la protéine apoB alors que le système MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> donne principalement lieu à des agrégations.

Dans le système MPO / glucose-oxydase, on constate une diminution de la proportion en acides gras polyinsaturés au niveau des phospholipides de la fraction D par rapport à la fraction native.

##### Altération de la composition en acides gras

% dans fraction native      fraction D

Acide Arachidonique (C20:4 n-6)	8,2	6,3
Acide Eicosapentaénoïque (C20:5n-3)	1,3	0,9
Acide Docosahexaénoïque (C22:6 n-3)	4,6	3,1

30

Les fractions oxydées obtenues par le système MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ne montrent, quant à elles, aucune modification significative de la composition en acides gras. Ces résultats indiquent que l'oxydation induite par la glucose-oxydase cause des

35

dégâts peroxydatifs au niveau des acides gras polyinsaturés des LDL, ce qui n'est pas le cas pour le système MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

5 On ne note pas de différences de composition au niveau des esters de cholestérol, ni des triglycérides dans les 2 systèmes d'oxydation.

10 On a constaté que les fractions issues de l'oxydation par le système MPO/ Glucose-oxydase sont le résultat d'une attaque de la MPO suivie de diverses réactions radiculaires tandis que les fractions dérivant de l'oxydation par le système MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, semblent être tout-à-fait spécifiques d'une attaque par la MPO.

15 Ce dernier système sera donc préféré pour la réalisation de l'invention.

### 3. Production et caractérisation des anticorps monoclonaux

20 Les antigènes contre lesquels sont dirigés les anticorps monoclonaux de la présente invention sont constitués par les différentes fractions oxydées des LDL, plus particulièrement cependant contre la fraction B.

25 Les LDL de patients semblant s'oxyder plus rapidement que celles de sujets normaux, un des buts de l'invention est de pouvoir différencier les fractions très oxydées (fractions C et D) de fractions pas ou peu oxydées (fractions A et B) afin de pouvoir déterminer  
30 quantitativement la présence de la fraction B.

L'invention concerne également les hybridomes utilisables pour la production des anticorps susmentionnés.

35

Les hybridomes sont obtenus par exemple de manière classique par fusion de cellules de myélome non sécrétrices P3 x 3Ag8.653 (ATCC CRL-1580) avec les cellules spléniques de la souris immunisées, en présence  
5 de polyéthylène glycol 4.000.

Les cellules fusionnées sont réparties dans des boîtes de 96 puits préincubées avec des macrophages péritonéaux de souris en présence d'un milieu de sélection contenant de l'hypoxantine, aminoptérine et thymidine. Le milieu est  
10 remplacé au jour 7 par un milieu non sélectif. Deux semaines après la fusion, les surnageants des clones sont criblés pour la présence d'anticorps spécifiques sur chacune des fractions A à D de LDL oxydée, ainsi que sur  
15 la MPO.

Dans ces tests, l'antigène purifié (fraction de LDL oxydée) est fixé sur la plaque et le surnageant, seul ou en compétition avec une fraction purifiée, est déposé sur  
20 la plaque. L'anticorps fixé est ensuite révélé par un 2ème anticorps dirigé contre les IgG de souris et couplé à la phosphatase alcaline.

On a ainsi pu obtenir deux types d'anticorps monoclonaux reconnaissant spécifiquement des LDL altérées par la MPO. L'un reconnaît la sous-fraction B, l'autre reconnaît la sous-fraction C et la sous-fraction D.  
25

Au vu de la caractérisation des fractions obtenues par les deux systèmes d'oxydation ( $H_2O_2$ , glucose oxydase), les deux anticorps reconnaissent des épitopes différents.  
30

En effet, l'anticorps anti-fraction B reconnaîtrait une altération précoce engendrée principalement par l' $HOCl$  alors que l'anticorps anti-fraction C/D serait dirigé  
35

contre des dégâts engendrés non seulement par l' $\text{HOCl}$  mais aussi par d'autres réactions et/ou réarrangements radicalaires obtenus par l'oxydation due au système MPO-glucose oxydase. Avec le système MPO/ $\text{H}_2\text{O}_2$  on  
5 n'observe pas de fraction D.

Production d'anticorps monoclonaux de spécificité anti-fraction B

10 Un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope peu oxydé des LDL (fraction B) a été caractérisé. Les souris ont été immunisées selon le même protocole que précédemment, à la différence que l'antigène fraction B a été injecté en présence d'hydroxyde d'aluminium. Cette fraction B a été  
15 oxydée à l'aide de MPO en présence d' $\text{H}_2\text{O}$ . Quatre hybridomes AG9, AE2, EB2 et EF2 sécréteurs d'anticorps monoclonaux dirigés contre la fraction B des LDL ont été obtenus.

20 Les surnageants des sous-clones de AE2, AG9, EB2 et EF2 ont été testés non seulement pour leur spécificité antigénique contre les différentes fractions mais aussi pour leur appartenance aux différentes classes et sous-classes d'immunoglobulines. Ces clones sont de classe IgG  
25 et de sous-classe IgG1, la chaîne légère est de type K. Ces hybridomes sécrètent des anticorps monoclonaux de spécificité dirigée contre la fraction B oxydée par la rMPO. Trois hybridomes sécréteurs ont été adaptés progressivement à la culture sans sérum en milieu  
30 hybridoma SFM (Life Technologies).

Les surnageants de ces 3 hybridomes sécréteurs ont été purifiés par passage sur une colonne de Protéine A-Sepharose CL-4B conditionnée en PBS à pH 8. L'élution a  
35 été réalisée en acide citrique 0,1M à différents pH, (6,5

IgG1 - 4,5 IgG2a - 3 IgG2b).

Production des IgG monoclonales spécifiques de la  
fraction B

clone		mg totaux
AG948F4A2	Fraction 1	1,3 mg
	Fraction 2	2,6 mg
EB2E9G62IH2		4,53 mg
EB2G3G2		2,6 mg

La reconnaissance de l'antigène fraction B oxydée par les  
3 anticorps monoclonaux est très semblable et est  
illustrée à la FIG. 3 (antigène Box)

Le tableau suivant présente les caractéristiques de  
quelques anticorps monoclonaux isolés dans le cadre de la  
présente invention en adoptant le processus susmentionné.

anticorps monoclonaux	spécificité (fractions de LDL oxydées)				typage	
	A	B	C	D	chaîne lourde	chaîne légère
14A2G6	-	-	+	+	IgG1	K
10G1E11E9	-	-	+	+	IgG2a	K
5C4B5E11	-	-	+	+	IgM	K
9B5D6E6	-	-	+	+	IgM	K
1E3E4C9	-	-	+	+	IgM	K
AG948F4A2	-	+	-	-	IgG1	K
EB2E9G62IH2	-	+	-	-	IgG1	K
EB2G3G2	-	+	-	-	IgG1	K
3H5	+	+	+	-		
7F8	+	+	+	-		
8B1	+	+	-	-		



Les hybridomes AG948F4A2, EB2E9G621H2, EB2G3G2 et 14A2G6 ont été déposés au BCCM (Belgian Coordinated Collections of Microorganisms le 19 décembre 2001 sous les numéros provisoires suivants :

- 5 1) 14A2G6 --> LMBP 5828CB
- 2) AG948F4A2 --> LMBP 5829CB
- 3) EB2E9G621H2 --> LMBP 5830CB
- 4) EB2G3G2 --> LMBP 5831CB

#### 10 Caractérisation des anticorps monoclonaux

##### Spécificité de l'épitope

Des test ELISA compétitifs ont été menés afin de démontrer  
15 l'identité ou la différence des épitopes reconnus par les anticorps selon l'invention.

Ces test ont été réalisés sur une plaque couverte de LDLox. On ajoute un anticorps marqué mis en compétition  
20 avec des concentrations croissantes des autres anticorps non marqués. Une diminution du signal signifie une compétition pour le même épitope. Par contre si l'anticorps marqué reconnaît un épitope différent de celui du compétiteur, il n'y aura aucune inhibition du signal.

25

Le marquage des anticorps à l'iode 125 a été réalisé à l'aide de billes IODO-Beads (Pierce) porteuse de chloramine-T. Ces anticorps marqués ont été purifiés sur  
des colonnes de 5ml de résine Sephadex-G25 Fine  
30 (Pharmacia) et caractérisé par précipitation au TCA.

Les figures 4a-b-c représentent les graphiques des tests ELISA de compétition entre un anticorps marqué (AG948F4A2, EB2G3G2, 14A2G6) et les autres anticorps  
35 monoclonaux non marqués.

Etant donnée l'inhibition du signal, on peut conclure que les trois anticorps dirigés contre la fraction B des LDL oxydées, quoique présentant un comportement différent, reconnaissent au moins une partie du même épitope. Par contre, l'anticorps 14A2G6 reconnaît un épitope différent des autres anticorps, son signal restant constant en présence des autres anticorps.

#### 10 Affinité des anticorps

L'affinité de plusieurs anticorps selon l'invention a été estimée en réalisant des test ELISA compétitifs comme ci-dessus, la seule différence étant la mise en compétition de l'anticorps marqué avec son homologue froid. On a observé que les anticorps ont une affinité de l'ordre de  $5 \times 10^{-8}$  M pour EB2E9G621H2, EB22G3G2, AG948F4A2 et d'environ  $10^{-9}$  M pour 14A2G6. Ces valeurs ont été mesurées en prenant la concentration en anticorps induisant un pourcentage d'inhibition égal à 50%.

#### Spécificité de la reconnaissance des anticorps monoclonaux

On a démontré que les quatre anticorps monoclonaux susmentionnés sont spécifiques des LDL oxydées par le système myéloperoxydase. Des test ELISA ont été effectués avec des LDLs fraîches et âgées de 2 jours, des LDL en présence d' $\text{HOCl}$  et de LDL oxydées par du  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1mM et 2mM), chaque fois en absence de rMPO, ainsi qu'avec l'ApoB100 native et oxydée, les HDL, l'Apo A-I native ou oxydées par la MPO, et les VLDL natives et les VLDL oxydées. Seul l'oxydation par le  $\text{HOCl}$  fournit des produits reconnaissables par ces anticorps.

On a noté cependant que l'anticorps 14A9G6 est moins spécifique et reconnaît aussi les VLDL oxydées par la myéloperoxydase.

5 On sait par ailleurs que ces anticorps ne reconnaissent pas non plus la fraction B des LDL oxydées au cuivre ou au MDA.

On a observé par ailleurs une équivalence des reconnaissances des LDLox et de l'ApoB100ox , ce qui  
10 démontre que l'oxydation des LDL par la MPO dans les conditions décrites, provoque l'oxydation de la partie protéique des LDL. Cette équivalence permet par ailleurs, de manière avantageuse, d'utiliser l'ApoB100ox comme standard dans les tests diagnostics faisant intervenir les  
15 anticorps selon l'invention.

On a également démontré que les anticorps selon l'invention se conservent très bien au moins pendant deux ans à 4°C, -20°C et -80°C (en présence de glycérol pour -20°C). Ces  
20 anticorps seront de préférence conservés aux environs de -20°C ou de -80°C.

#### 4. Test ELISA des LDL naturellement oxydées circulantes dans le plasma

25

Des tests ELISA mesurant les LDL oxydées par la MPO dans la circulation ont ainsi été développés dans le cadre de la présente invention.

30 Ces tests ne faisant pas appel à une oxydation ex vivo des LDL (constituant une phase très délicate), peuvent être réalisés en routine.

Un des tests selon une mise en oeuvre de l'invention peut  
35 se résumer de la façon suivante :

- fixation de l'anticorps monoclonal anti-fraction B sur la plaque
- extraction des LDL oxydées du plasma par adsorption sur l'anticorps monoclonal
- 5    - reconnaissance des LDL fixées à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-apoB couplé à la peroxydase
- révélation par un mélange d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / ortho-phénylène diamine (lecture de la densité optique à 490 nm)
- détermination de la concentration en LDLox dans
- 10   l'échantillon grâce à une gamme standard de la fraction B de LDL oxydées par la MPO et isolées par FPLC (fraction Box) ou grâce à une gamme d'ApoB100 oxydée.

15    Pour confirmer la faisabilité du test selon l'invention, un standard de la fraction (Box) de LDL oxydées a été appliqué à des concentrations croissantes (de 0 à 24 µg de protéine par puits). Les 3 anticorps monoclonaux (EB2E9G621H2, EB2-g3g2 et AG948F4A2) reconnaissant la fraction B oxydée ont été testés.

20    Les résultats montrent une bonne réponse des 3 anticorps vis-à-vis des concentrations croissantes de standards, linéaire dans une première phase et atteignant un plafond pour les concentrations plus élevées. Ce plateau peut

25   être expliqué par la limite supérieure de détection du test et/ou par une perturbation due à la présence de NaCl dans la fraction Box (plus importante lorsque la concentration en Box augmente). Chaque courbe a été reproduite plusieurs fois avec la même fraction Box et

30   montre une bonne reproductibilité.

     Cependant, des fractions Box dérivant de deux oxydations différentes ne génèrent pas des courbes standards identiques. En fait, la séparation par FPLC permet une

35   séparation en fonction de la charge électrique, mais ne

renseigne pas sur la nature chimique de l'épitope.

5 Afin d'obtenir un standard pur pour les analyses de  
fraction Box, standard reconnu spécifiquement par les  
anticorps monoclonaux, selon l'invention, on propose  
d'utiliser des LDLox délipidés, ce qui correspond à l'Apo  
B100 oxydée purifiée à partir de LDL oxydées par la MPO,  
selon le protocole suivant (décrit par Socorro et Camero,  
10 J. Lipid Research : 20, 631, 1979).

Les LDLox selon l'invention, mises dans une solution de  
tampon 50 mM Tris/HCl pH 8,8 sont déposées sur une colonne  
(1,5 x 15 cm) de DEAE- Sépharose CL-6B (Pharmacia) et  
15 immédiatement, un gradient linéaire de Triton X-100 de 0 à  
2% est appliqué (60ml). Après élution des lipides avec le  
détergent, l'apo LDL (apo B100 ox) est éluee par le tampon  
50 mM Tris/HCl pH 7.4, contenant 1M NaCl.

20 L'apo B100 ox, analysée par électrophorèse en gel de  
polyacrylamide présente une bande unique immunoréactive  
avec l'antisérum anti apo B100 et avec les anticorps  
monoclonaux.

25 Par ailleurs, la conservation des fractions peut être  
favorablement effectuée en présence de glycérol ou de  
sucrose.

30 La courbe dose-réponse de LDL natives (à concentration  
plasmatique) a également été testée en parallèle avec le  
plasma original correspondant . Comme attendu, des  
concentrations croissantes de LDL natives engendrent une  
augmentation proportionnelle du signal. Cependant, la  
réponse obtenue pour le plasma est nulle ou nettement

inférieure à celle des LDL natives. Ceci indique qu'un (ou plusieurs) composant(s) du plasma peu(ven)t inhiber la reconnaissance des LDLox par les monoclonaux.

- 5 Parmi les composants plasmatiques susceptibles d'influencer la liaison de LDLox avec le monoclonal, on peut distinguer deux grandes catégories :
- les lipoprotéines, et notamment les particules contenant de l'apoB (LDL natives et VLDL)
  - 10 -les protéines

On a confirmé la fiabilité du test, en vérifiant que l'apoB non modifiée par la MPO, et présente sur les LDL ainsi que sur les VLDL, ne pouvait entrer en compétition  
15 avec l'apoB modifiée, au niveau de l'anticorps monoclonal.

La courbe dose-réponse pour les LDL natives montrent un signal qui pourrait correspondre à la présence d'une petite proportion de LDL oxydées dans ces LDL natives.  
20

On a également vérifié que l'albumine n'interfère pas au niveau de la liaison anticorps-antigène.

25 Plusieurs solutions sont proposées pour éliminer ou minimiser les interférences observées dans le plasma.

Tout d'abord, l'échantillon peut être pré-purifié en utilisant des membranes semi-perméables permettant d'éliminer des molécules jusqu'à 100.000 Da. D'autre  
30 part, les IgG peuvent être écartées par des techniques d'immunoprécipitation.

On a cependant observé que les interférences peuvent être limitées par la dilution de l'échantillon. En effet, il  
35 a été observé une augmentation de l'interférence pour de

faibles dilutions du plasma, alors que des dilutions plus importantes tendent à limiter ces perturbations. D'autre part, en parallèle avec une dilution de l'échantillon, différentes techniques connues en soi permettent  
5 d'amplifier le signal.

A titre d'exemple une variante préférée du test de mesure directe de LDLs naturellement oxydées circulantes consiste en un test ELISA sandwich décrit ci-après :

10

- revêtement de plaques F 96 maxisorb nunc immuno plate No 4 4 2 3 0 4 avec les anticorps monoclonaux (100 µl/puits)

15

plaque no 1 Mab AG 948 F4 A2 (anti B) à 5,3 ng/puits

plaque no 2 Mab EB 2 A 9 G 6 21 H2 (anti B), à 5,3 ng/puits

plaque no 3 Mab EB2 G3 G2 (anti B) à 5,3 ng/puits

20

dans le tampon 50 mM carbonate/bicarbonate, pH 9,6

25

- Saturation des plaques en caséine 0,1 % après lavage en TBS Tween, 60 min à 37 deg C

- disposition des échantillons: plasma dilué 10 fois dans du PBS pH 7,5 (H<sub>2</sub>O HPLC), 60 min à 37 deg C, puis lavage par TBS Tween. Idéalement un témoin négatif et un standard B oxydé sont également disposés sur la plaque.

30

- fixation du 2ème anticorps : anticorps polyclonal de lapin anti apolipoprotéine B 100 à 1 µg/ml, 60 min à 37 deg

- fixation de l'anticorps couplé : anticorps de chèvre anti IgG(Fc) de lapin couplé à la phosphatase alcaline (Proméga, cat no S3731), dilué 7500 fois dans le tampon de caséine,

35

- révélation : à l'aide du substrat de la phosphatase alcaline : para nitrophényl phosphate à 1 mg/ml dans le

tampon diéthanolamine pH 9,8.

On constate que les 3 anticorps fournissent des résultats comparables.

5

Un exemple de résultats est repris à la FIG. 5 pour 13 patients et un témoin négatif (50 min de révélation) en utilisant l'anticorps EB 2 A 9 G 6 21 H2 déjà mentionné.

10

En reproduisant le test avec des échantillons de plasma dilués 50 x les résultats sont identiques.

15

5. Test de type ELISA de mesure de sensibilité à l'oxydation ex-vivo des LDL

20

Selon l'invention, les caractéristiques cinétiques de l'oxydation des LDL par la myéloperoxydase sont également avantageusement exploitées dans un but de diagnostic.

25

Ce test comprend 3 étapes :

- 1) Fixation des LDL du plasma sur un anticorps polyclonal anti-apo B
- 2) Oxydation des LDL par le système MPO / peroxyde d'hydrogène. 12,5 mU MPO ont été utilisés en présence de 40µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par puits, ces conditions ayant été ensuite modifiées pour ralentir l'oxydation, en réduisant de 5 fois la quantité d'agents pro-oxydants et en utilisant 2,5 mU MPO et 8µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par puits.
- 3) Reconnaissance d'un épitope spécifique de LDL oxydées

35



par un anticorps monoclonal selon l'invention

4) Reconnaissance de l'anticorps monoclonal par des IgG couplées à la phosphatase alcaline, anti IgG de souris.

5        Afin d'optimiser les conditions d'oxydation discriminant les patients des personnes saines, on a utilisé les deux anticorps monoclonaux obtenus (anti fraction B et anti fraction C/D) à notre disposition.

10       La procédure du dosage est illustrée à la FIG. 6 .

Plusieurs séries d'oxydation ont été réalisées sur des plasma provenant de volontaires sains et de patients.

15       L'oxydation des LDL a été suivie au cours du temps par l'apparition des épitopes B et C. Il est apparu rapidement nécessaire de déterminer une valeur seuil d'oxydation définissant une oxydation normale ou pathologique. A cet effet, la mesure d'un rapport C/B peut constituer un standard interne de la réaction.

20

Vingt-cinq échantillons provenant de volontaires sains ont été testés afin de déterminer une valeur moyenne «normale » du rapport C/B, la moyenne obtenue correspond à un rapport C/B de 1,26 et l'écart-type est de 0,16. La

25       gamme « normale » établie correspond donc à un rapport C/B allant de 0,94 à 1,58 (moyenne  $\pm$  2 SD).

30

Les plasmas de 33 patients ont été testés et ont été comparés à la gamme «normale » établie sur des plasmas de personnes « saines ». Onze d'entre eux se distinguaient de la «normale» (FIG. 6). Parmi les patients présentant une sensibilité à l'oxydation supérieure à la « normale », il était particulièrement intéressant de noter que certains ne présentaient pas de facteurs de risque classiques tels

que cholestérol et/ou triglycérides élevés, ou plus récents comme les LDL petites et denses ou la Lp(a), et que cependant il présentaient une coronaropathie sévère (angor instable, infarctus, ... ).

5

Ce test s'est donc révélé d'un grand intérêt en prévention primaire en mettant en évidence un risque potentiel alors que les autres paramètres utilisés couramment s'avèrent négatifs.

10

La FIG. 7 illustre ainsi une comparaison de la sensibilité à l'oxydation des LDL de 33 patients par rapport à une population contrôle, les résultats étant exprimés en pourcentage par rapport au contrôle.

15

La reproductibilité intra essai, testée par la réalisation de plusieurs cinétiques sur une même plaque, est tout à fait acceptable. Par contre, la reproductibilité inter-essais, testés par comparaison des résultats obtenus pour un même échantillon sur des plaques différentes, est médiocre. On introduira donc un échantillon contrôle sur chaque plaque pour pouvoir interpréter les résultats obtenus sur différentes plaques.

20

25

Les cinétiques obtenues montrent qu'avec l'anticorps anti-fraction B, les résultats sont très reproductibles alors que ceux obtenus avec l'anti C/D présentent des variations. Il a en effet été vérifié qu'un même individu pris à différent moments donnait des résultats comparables, en effectuant 3 prises de sang à plusieurs jours d'intervalle chez un même volontaire.

30

On peut donc conclure que la mesure de la cinétique d'oxydation des LDL peut être effectuée dans de bonnes conditions en utilisant l'anticorps anti-fraction B.

35

6. Test Elisa de mesure d'autoanticorps circulants dirigés contre les LDL oxydées (fraction B).

5

Selon encore un autre aspect de l'invention on propose un test basé sur la détection des anticorps naturels (dénommés ci-après autoanticorps) dans le plasma, dirigés contre des LDL oxydées par la myéloperoxydase.

10

On a en effet observé que le plasma contient des autoanticorps dirigés spécifiquement contre les fractions de LDL oxydées par la myéloperoxydase en présence de  $H_2O_2$ , et non contre les fractions obtenues par oxydation avec d'autres agents tels que le sulfate de cuivre, l'AAPH ou un azoinitiateur.

15

Le taux d'autoanticorps reconnaissant ces LDL oxydées est un reflet du statut oxydatif dans la mesure où la modification des LDL résulte en l'apparition de nouveaux épitopes rendant les lipoprotéines plus antigéniques. Ce dosage permet également d'évaluer la capacité du système immunitaire à répondre à l'apparition de ces LDL modifiées.

20

25

Selon l'invention on propose donc un test de type ELISA permettant de déterminer quantitativement la présence d'autoanticorps contre des sous-fractions spécifiques chez des malades présentant une pathologie cardio-vasculaire.

30

Un des tests selon une mise en œuvre de l'invention peut se résumer de la façon suivante :

- fixation des LDL oxydées ou des VLDL oxydées par la MPO sur la plaque

- addition des sera dilués 1/10 et 1/50
- reconnaissance des anticorps fixés à l'aide d'un anticorps polyclonal de chèvre anti IgG humaine (chaîne lourde et légère) couplé à la phosphatase alcaline
- 5 - révélation par le substrat de la phosphatase alcaline (paranitrophénylphosphate dans un tampon diéthanolamine).
- lecture à 410 nm, avec la référence à 630 nm

10 Le tableau suivant indique les réponses observées pour 5 patients, sous la forme des rapports entre le signal obtenu avec des LDL oxydées de différentes manières et celui du blanc correspondant, c'est à dire pour les LDL natives. Un rapport de 1 (ou <1) signifie que

15 l'échantillon ne contient pas d'autoanticorps dirigés contre les LDL oxydées. A l'inverse, on peut postuler qu'un rapport > 2 traduit la présence d'autoanticorps.

	patient	LDL oxydées par Cu	par AAPH	par MPO
20	1	1,37	1,34	3,27
	2	<1	1,18	<1
	3	<1	1,25	3,91
	4	<1	1,47	3,74
	5	1,04	1,22	<1

25 Sur 3 des 5 sujets, on observe la présence d'autoanticorps dirigés contre les LDL oxydées par la MPO, alors qu'aucun sujet ne paraît contenir d'autoanticorps contre les LDL oxydées par le cuivre ou l'AAPH.

30 L'invention démontre donc la faisabilité et les avantages du dosage de LDL modifiées par l'action de la MPO dans la circulation.

## 7. Applications thérapeutiques et préventives

Selon un autre aspect de l'invention on propose une méthode de traitement immunothérapeutique consistant à  
5 traiter le sang d'un patient pour en retirer les antigènes (fractions de LDL oxydées, en particulier fraction B). Cette méthode consiste à faire passer le sang , ou une fraction de sang, d'un patient dans un système où il entrera en contact avec des anticorps anti-fraction B  
10 immobilisés par une fraction B de LDL oxydée, par exemple sur une colonne d'immunoabsorption spécifique, avant d'être retourné au patient, le sang ou la fraction de sang étant débarrassé desdits autoanticorps.

15 Selon encore un autre aspect de l'invention on propose une immunisation passive par administration à un patient à risque d'anticorps selon l'invention, par injection ou perfusion. Ce type de traitement pourrait s'appliquer, par exemple, après une opération de pontage coronarien.

20 Enfin selon un dernier aspect de l'invention, on propose d'injecter à un patient des protéines ApoB100ox apte à susciter une réponse immunitaire favorable.

## REVENDICATIONS

1. Composition constituée d'au moins une fraction oxydée de LDL obtenue par oxydation in vitro de LDL par l'acide hypochloreux ou par un système biologique ou chimique générateur d'acide hypochloreux.  
5
2. Composition selon la revendication précédente caractérisé en ce que l'oxydation est effectuée par action du peroxyde d'hydrogène et de myéloperoxydase.  
10
2. Composition constituée d'au moins une fraction oxydée de LDL telle que pouvant être obtenue par le peroxyde d'hydrogène ou le couple glucose/glucose-oxydase en présence de myéloperoxydase et d'ions chlorures.  
15
4. Composition selon la revendication 1, 2 ou 3 purifiée par chromatographie.
5. Composition selon la revendication précédente obtenue en utilisant une séparation par chromatographie du type Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC).  
20
6. Composition selon la revendication précédente obtenue en utilisant des tampons de concentrations croissantes en sels.  
25
7. Fraction B de LDL oxydée telle que pouvant être obtenue par une chromatographie de type FPLC à partir de LDL oxydée en présence de myéloperoxydase comme illustré à la Fig. 1.  
30
8. Composition selon n'importe laquelle des revendications précédentes qui a également été purifiée par immunoaffinité.  
35

9. Composition selon la revendication précédente purifiée par immunoaffinité en utilisant une colonne composée d'un anticorps monoclonal couplé à une matrice et dirigé contre ladite fraction.

10. Composition selon la revendication précédente dans laquelle la colonne est une colonne de Sepharose activé ou de billes de verre.

11. Composition selon n'importe laquelle des revendications précédentes caractérisée en ce qu'elle constitue ou est identique à une sous-fraction (B), sous-fraction des LDL oxydées la plus proche des LDL natives (A) en chromatographie du type Fast Protein Liquid Chromatography avec une colonne échangeuse d'anions Mono Q.

12. Composition selon n'importe laquelle des revendications 1 à 8 caractérisée en ce qu'elle est identique ou constitue une sous-fraction (C), sous-fraction des LDL oxydées qui suit la sous-fraction (B) en chromatographie du type Fast Protein Liquid Chromatography avec une colonne échangeuse d'anions Mono Q.

13. Composition constituée d'une fraction oxydée de LDL obtenue par oxydation in vitro de LDL par le couple glucose/glucose oxydase en présence de myéloperoxydase caractérisée en ce qu'elle comprend la sous-fraction D, sous-fraction des LDL oxydées la plus éloignée des LDL natives en chromatographie du type Fast Protein Liquid Chromatography avec une colonne échangeuse d'anions Mono Q.

14. Composition selon la revendication 13 caractérisée en ce qu'elle est constituée d'un mélange des sous-fractions C et D.

5 15. Composition selon la revendication 1 ou 2 dans laquelle la myéloperoxydase utilisée est une myéloperoxydase recombinante humaine.

10 16. Anticorps monoclonal dirigé contre un ou plusieurs composant d'une composition selon n'importe laquelle des revendications 1 à 15.

15 17 - Procédé d'obtention de fractions oxydées de LDL caractérisé en ce que les LDL sont oxydées par addition de peroxyde d'hydrogène en présence de myéloperoxydase et la fraction oxydée résultante est séparée puis fractionnée par chromatographie de type Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) en utilisant des tampons de concentration croissantes en sels.

20 18 - Utilisation des fractions d'oxydation selon n'importe laquelle des revendications 1-15 ou obtenues selon la revendication précédente pour l'obtention d'anticorps monoclonaux.

25 19 - Antigène constitué par une fraction d'oxydation isolée selon le procédé de la revendication 14.

30 20 - Antigène selon la revendication précédente constituée par la fraction B, fraction des LDL oxydées la plus proche des LDL natives en chromatographie du type Fast Protein Liquid Chromatography avec une colonne échangeuse d'anions Mono Q.

35 21 - Antigène selon la revendication 16 constitué par la



fraction C ou la fraction B, ou un mélange de ces fractions d'oxydation de LDL.

5 22 - Anticorps monoclonal dirigé contre un des antigènes des revendications 19 à 21.

10 23 - Anticorps monoclonal produit par l'hybridome AG948F4A2 déposé au BCCM sous le numéro LMB 5829CB le 19 décembre 2001.

24 - Anticorps monoclonal produit par l'hybridome EB2G3G2 déposé au BCCM sous le numéro LMBP 5831CB le 19 décembre 2001.

15 25 - Anticorps monoclonal produit par l'hybridome EB2E9G621H2 déposé au BCCM sous le numéro LMBP 5830CB le 19 décembre 2001.

20 26 - Anticorps monoclonal produit par l'hybridome 14A2G6 déposé au BCCM sous le numéro LMBP 5831CB le 19 décembre 2001.

25 27 - Hybridome AG948F4A2 déposé au BCCM sous le numéro le 19 décembre 2001.

28 - Hybridome EB2G3G2 déposé au BCCM sous le numéro le 19 décembre 2001.

30 29 - Hybridome EB2E9G621H2 déposé au BCCM sous le numéro le 19 décembre 2001.

30 - Hybridome 14A2G6 déposé au BCCM sous le numéro le 19 décembre 2001.

- 31 - Utilisation d'un anticorps selon n'importe laquelle des revendications 16 ou 22 à 26 pour un test d'oxydation ex vivo de LDL d'un patient.
- 5 32 - Utilisation d'un anticorps selon une des revendications 16 ou 22 à 26 pour un test de mesure de LDLox circulantes dans le sang humain.
- 10 33 - Utilisation d'une fraction de LDL oxydée isolée comme standard pour la détermination d'autoanticorps antifraction oxydée chez un patient.
- 15 34 - Utilisation selon la revendication 33 dans laquelle la fraction oxydée est la fraction B.
- 35 - Test, notamment pour la détermination du risque cardio-vasculaire d'un patient, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- fixation d'un anticorps monoclonal anti-fraction B sur un substrat solide
  - extraction des LDL oxydées du plasma par adsorption sur l'anticorps monoclonal
  - reconnaissance des LDL fixées à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-apoB
  - 25 - révélation quantitative de l'anti-corps polyclonal
  - détermination de la concentration en LDLox.
- 30 36 - Test selon la revendication 24 dans laquelle la révélation quantitative se fait par action de la phosphatase alcaline couplé à un anticorps dirigé contre l'anticorps polyclonal anti-apo B.
- 37 - Test selon la revendication précédente dans lequel

l'anticorps polyclonal anti-apo B est un anticorps de lapin et l'anticorps couplé à la phosphatase alcaline est un anticorps de chèvre anti-IgG(Fc) de lapin.

5 38 - Test selon la revendication 35 dans lequel l'anticorps polyclonal anti-apoB est couplé à une peroxydase.

10 39 - Test selon la revendication 35 dans lequel la concentration de LDLox dans l'échantillon est déterminée par comparaison avec un échantillon ou une gamme standard soit de la fraction B de LDL oxydée par la MPO et isolée par FPLC (fraction Box), soit de ApoB100ox oxydée par l'acide hypochloreux ou un système générant de l'acide  
15 hypochloreux.

40 - Test selon la revendication 35 ou 39 dans lequel le plasma est préalablement dilué entre 5 et plus de 40 fois.

20 41 - Test selon n'importe laquelle des revendications 35 à 40 dans lequel les IgG du plasma sont éliminées par des techniques d'immunoprécipitation.

25 42 - Procédé de détermination du taux circulant de LDL oxydées caractérisé en ce qu'il utilise des anticorps monoclonaux obtenus à partir d'au moins une fraction des LDL oxydées ex-vivo par la myéloperoxydase.

30 43 - Procédé de détermination du taux d'autoanticorps dirigés contre les LDL oxydées caractérisé en ce qu'il utilise des fractions de LDL oxydées selon n'importe laquelle des revendications 16 ou 22 à 26.

35 44 - Procédé de détermination de la sensibilité à l'oxydation par la MPO des LDL présentes dans le plasma

caractérisé en ce qu'il utilise des anticorps monoclonaux selon n'importe laquelle des revendications 16 ou 22 à 26.

5 45 - Procédé de diagnostic pour la prévention des accidents cardiovasculaires faisant intervenir au moins une des trois procédés des revendications 42 à 44.

10 46 - Procédé de diagnostic pour apprécier la sévérité d'un risque cardio-vasculaire d'un patient caractérisé en ce qu'il est basé sur les trois paramètres suivants :  
- taux circulant de LDL oxydées par la myéloperoxydase  
- taux d'autoanticorps dirigés contre les LDL oxydées par la MPO  
15 - sensibilité à l'oxydation par la MPO des LDL présentes dans le plasma du patient.

20 47 - Standard pur de la fraction B oxydée par la myéloperoxydase caractérisée en ce qu'il est obtenu à partir de ladite fraction par passage sur une colonne d'immunoaffinité comprenant un anticorps monoclonal anti-fraction B.

25 48 - Protéine ApoB100ox telle que pouvant être obtenue et purifiée à partir d'une LDL oxydée par action de HOCl.

49 - Protéine selon la revendication précédente purifiée par passage sur une colonne d'immunoaffinité comprenant un anticorps monoclonal anti-fraction B.

30 50 - Standard utilisé dans des tests de diagnostic basés au moins partiellement sur la présence de LDL oxydées comportant une protéine selon n'importe laquelle des trois revendications précédentes.

35 51 - Kit d'application diagnostique comprenant au moins

- un anticorps monoclonal selon n'importe laquelle des revendications 16 et 22 à 24.

5 52 - Kit selon la revendication 35 comprenant également un standard ou une gamme de standards consistant en une ou des compositions selon les revendications 1 à 15 et 47 à 50.

10 53 - Test , notamment pour la détermination du risque cardio-vasculaire d'un patient, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- fixation de LDL oxydées sur un substrat solide
- fixation d'un anticorps monoclonal anti-fraction B à ladite LDL oxydée fixée
- 15 - association des LDL oxydées du plasma audit anticorps et libération de l'anticorps monoclonal dudit substrat
- détermination de l'anticorps monoclonal restant fixé
- détermination de la concentration en LDL oxydées du plasma.

20 54 - Procédé de traitement consistant à traiter le sang ou des portions de sang d'un patient pour en retirer les composants fractions oxydées de LDL, avec des anticorps selon n'importe laquelle des revendications 16 et 22 à 24, 25 immobilisés sur support, par exemple sur une colonne d'immunoabsorption, avant d'être retourné au patient.

30 54 - Procédé de traitement consistant à traiter le sang ou des portions de sang d'un patient pour en retirer la fraction B de LDL oxydées par contact avec des anticorps anti-fraction B immobilisés sur un support d'immunoabsorption, avant d'être retourné au patient.

35 55 - Procédé de traitement thérapeutique ou préventif consistant à administrer à un patient, par injection ou

perfusion, des anticorps selon n'importe laquelle des revendications 16 ou 22 à 24.

- 5      56 - Procédé de traitement thérapeutique ou préventif consistant à administrer à un patient, par injection ou perfusion, une protéine selon n'importe laquelle des revendications 48 ou 49.

1/5

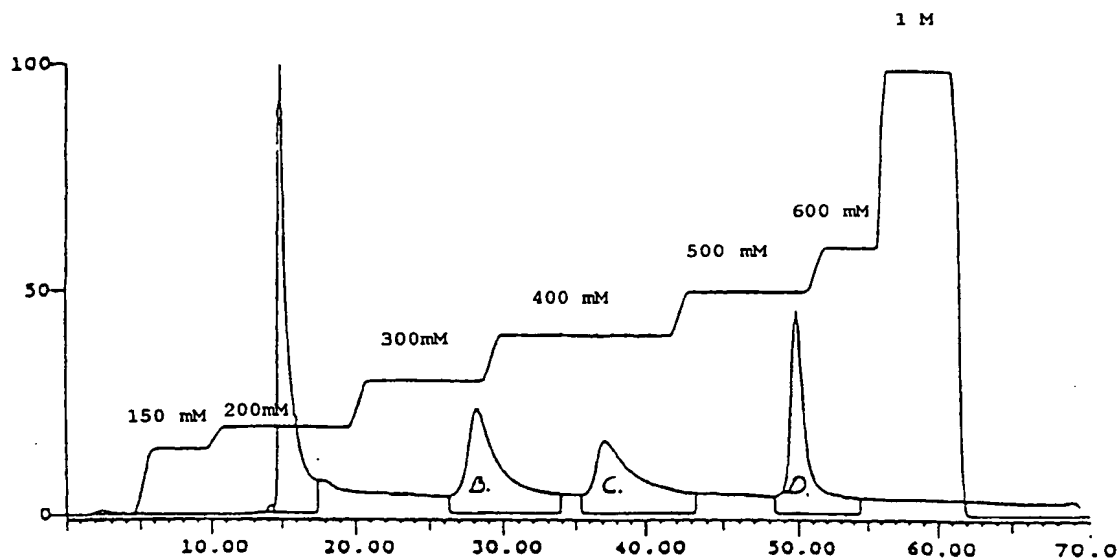


FIG. 1

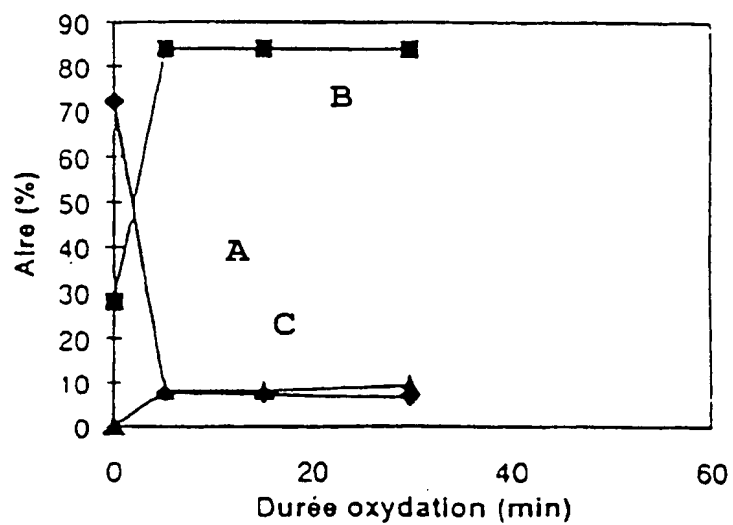


FIG. 2

Reconnaissance de l'antigène Box par les 3 anticorps monoclonaux anti-Box

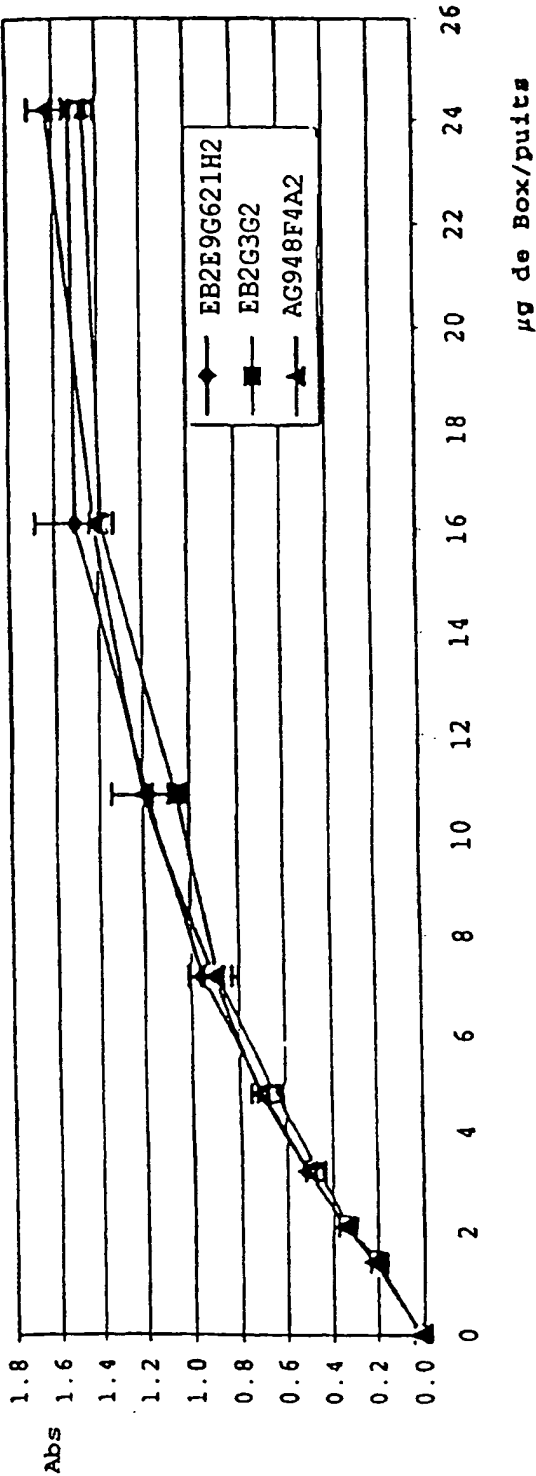


FIG. 3



3/5

## AG948F4A2 marqué

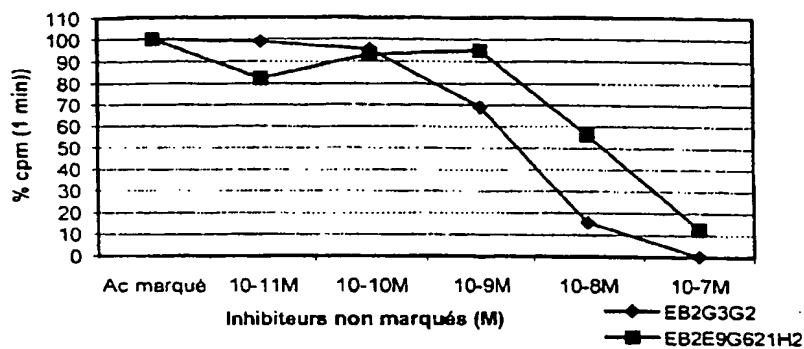


FIG. 4a

## EB2G3G2 marqué

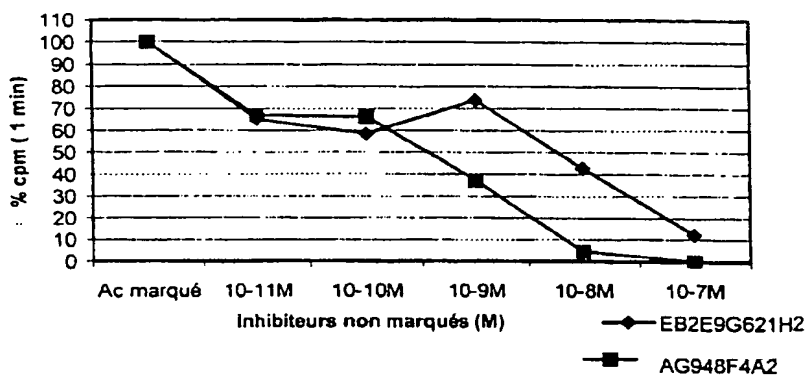


FIG. 4b

## 14A2G6 marqué

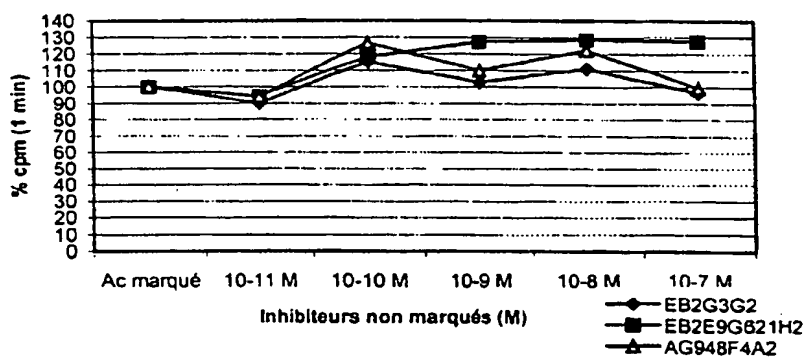


FIG. 4c

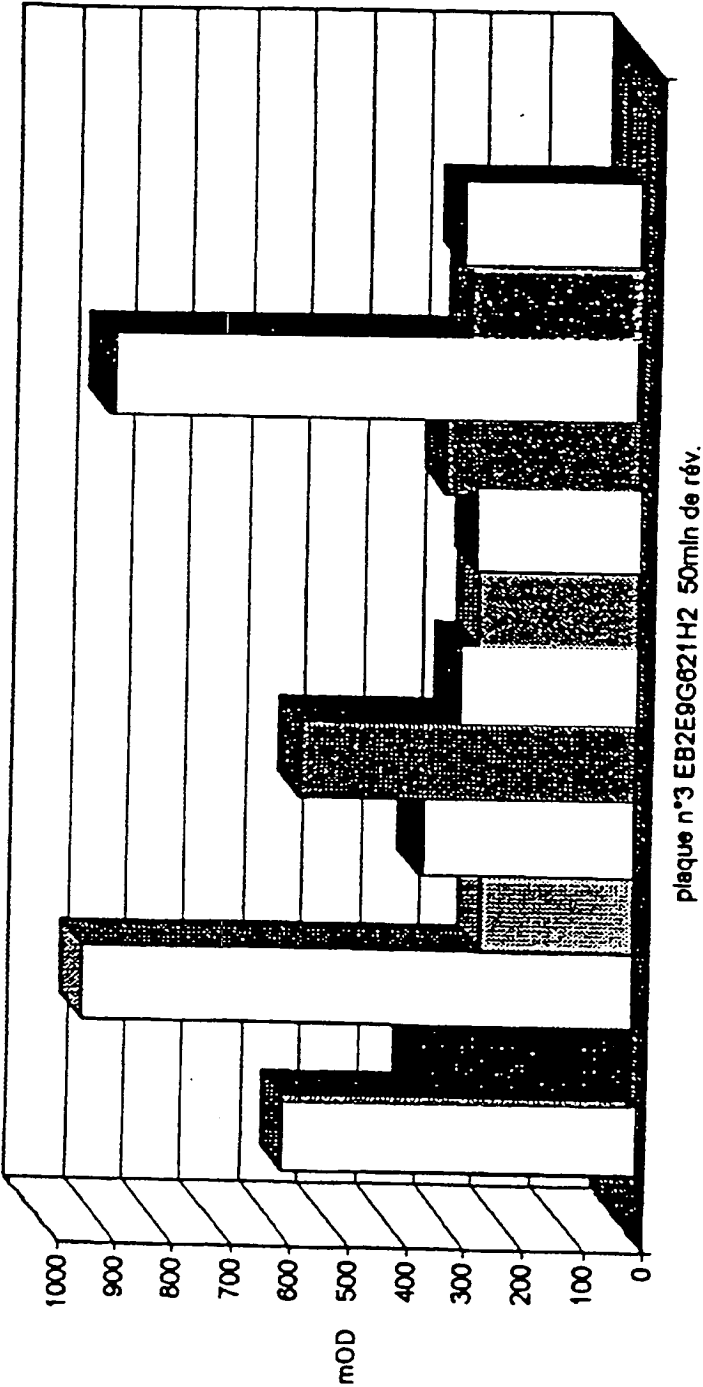


FIG. 5

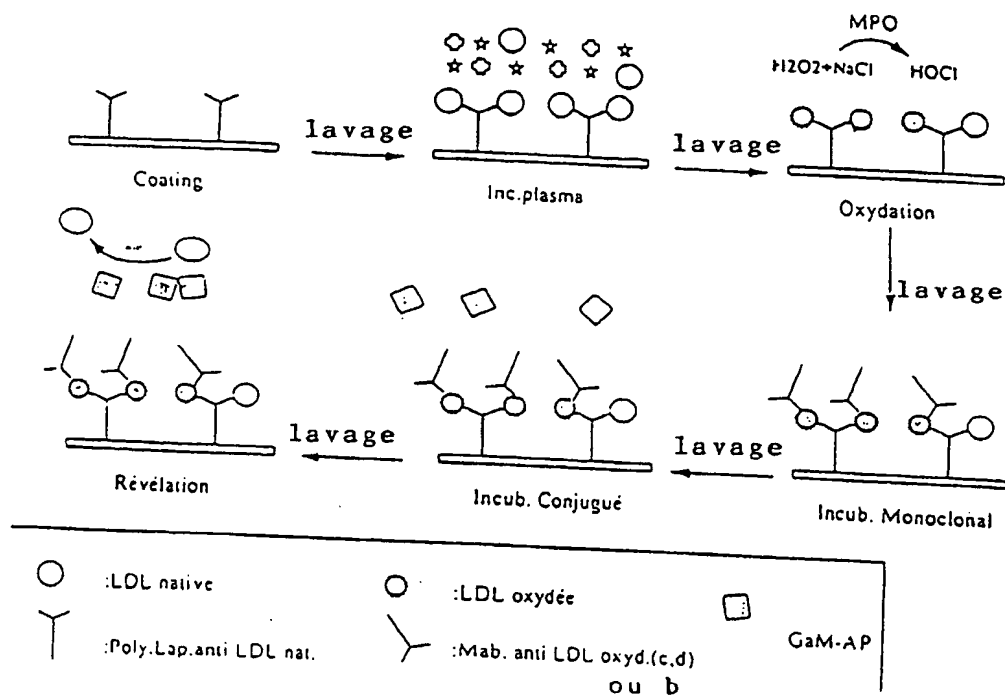


FIG. 6

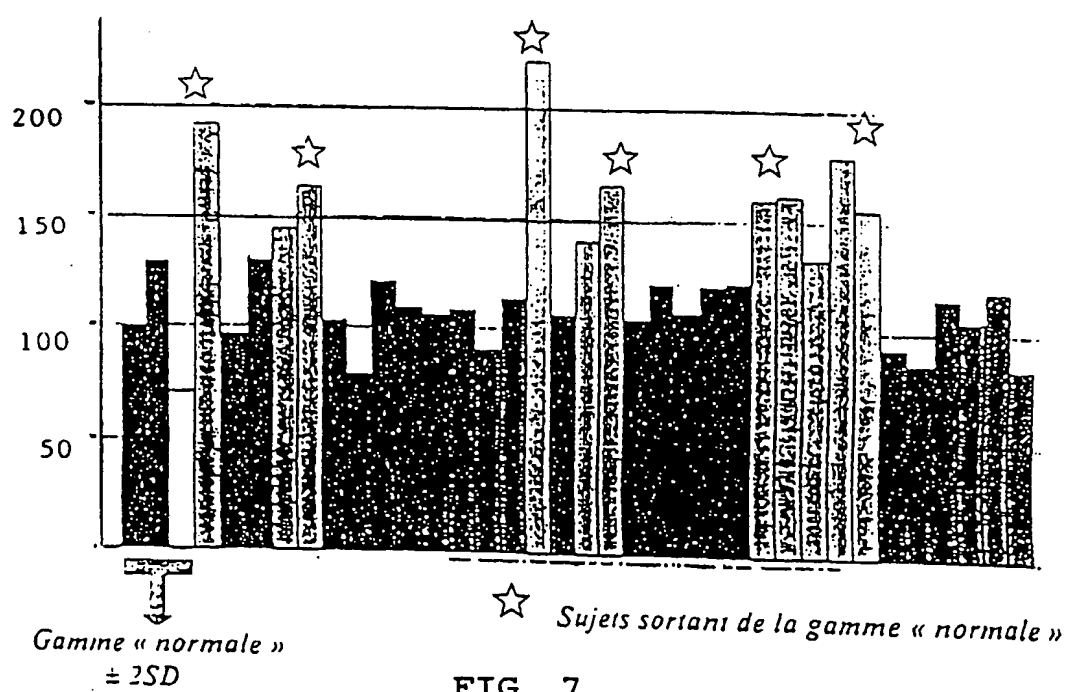


FIG. 7

Référence du dossier du déposant ou du mandataire	ULB2	Demande internationale n°	PCT/EP 0 1 / 1 5 2 7 9
---	------	---------------------------	------------------------

**INDICATIONS RELATIVES À UN MICRO-ORGANISME OU  
AUTRE MATÉRIEL BIOLOGIQUE DÉPOSÉ**

(règle 13bis du PCT)

A. Les indications ont trait au micro-organisme ou autre matériel biologique visé dans la description page <u>16</u> , ligne <u>5</u>	
B. IDENTIFICATION DU DÉPÔT <span style="float: right;">D'autres dépôts font l'objet d'une feuille supplémentaire <input checked="" type="checkbox"/></span>	
Nom de l'institution de dépôt <b>BCCM - LMBP</b> <b>Belgian Coordinated Collections of Microorganisms</b>	
Adresse de l'institution de dépôt ( <i>y compris le code postal et le pays</i> ) <b>Laboratorium voor Moleculaire Biologie LMBP</b> <b>Universiteit Gent (RUG)</b> <b>K.L. Ledeganckstraat 35 B-9000 Gent</b> <b>Belgique</b>	
Date du dépôt <b>19 décembre 2001</b>	n° d'ordre <b>LMBP 5828CB</b>
C. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES ( <i>le cas échéant</i> ) <span style="float: right;">Une feuille supplémentaire est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/></span>	
D. ÉTATS DESIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES ( <i>si les indications ne sont pas données pour tous les États désignés</i> )	
E. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT ( <i>le cas échéant</i> )	
Les indications énumérées ci-après seront fournies ultérieurement au Bureau international ( <i>spécifier la nature générale des indications p. ex., "n° d'ordre du dépôt"</i> )	
<p align="center">Réservé à l'office récepteur</p> <p><input type="checkbox"/> Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale</p> <p>Fonctionnaire autorisé</p>	<p align="center">Réservé au Bureau international</p> <p><input type="checkbox"/> Cette feuille est parvenue au Bureau international le :</p> <p>Fonctionnaire autorisé</p>

Référence du dossier du déposant ou du mandataire	ULB2	Demande internationale n°	PCT/EP 01 / 15279
---	------	---------------------------	-------------------

**INDICATIONS RELATIVES À UN MICRO-ORGANISME OU  
AUTRE MATÉRIEL BIOLOGIQUE DÉPOSÉ**

(règle 13bis du PCT)

A. Les indications ont trait au micro-organisme ou autre matériel biologique visé dans la description page <u>16</u> , ligne <u>6</u>	
B. IDENTIFICATION DU DÉPÔT <span style="float: right;">D'autres dépôts font l'objet d'une feuille supplémentaire <input checked="" type="checkbox"/></span>	
Nom de l'institution de dépôt <b>BCCM - LMBP</b> <b>Belgian Coordinated Collections of Microorganisms</b>	
Adresse de l'institution de dépôt ( <i>y compris le code postal et le pays</i> ) <b>Laboratorium voor Moleculaire Biologie LMBP</b> <b>Universiteit Gent (RUG)</b> <b>K.L. Ledeganckstraat 35 B-9000 Gent</b> <b>Belgique</b>	
Date du dépôt <b>19 décembre 2001</b>	n° d'ordre <b>LMBP 5829CB</b>
C. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES ( <i>le cas échéant</i> ) <span style="float: right;">Une feuille supplémentaire est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/></span>	
D. ÉTATS DÉSIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES ( <i>si les indications ne sont pas données pour tous les États désignés</i> )	
E. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT ( <i>le cas échéant</i> )	
Les indications énumérées ci-après seront fournies ultérieurement au Bureau international ( <i>spécifier la nature générale des indications p. ex., "n° d'ordre du dépôt"</i> )	

Réservé à l'office récepteur	
<input type="checkbox"/>	Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale
Fonctionnaire autorisé	

Réservé au Bureau international	
<input type="checkbox"/>	Cette feuille est parvenue au Bureau international le :
Fonctionnaire autorisé	

Référence du dossier du déposant ou du mandataire	ULB2	Demande internationale	PCT/EP 01 / 15279
---	------	------------------------	-------------------

**INDICATIONS RELATIVES À UN MICRO-ORGANISME OU  
AUTRE MATÉRIEL BIOLOGIQUE DÉPOSÉ**

(règle 13bis du PCT)

A. Les indications ont trait au micro-organisme ou autre matériel biologique visé dans la description page <u>16</u> , ligne <u>7</u>	
B. IDENTIFICATION DU DÉPÔT <span style="float: right;">D'autres dépôts font l'objet d'une feuille supplémentaire <input checked="" type="checkbox"/></span>	
Nom de l'institution de dépôt <b>BCCM - LMBP</b> <b>Belgian Coordinated Collections of Microorganisms</b>	
Adresse de l'institution de dépôt ( <i>y compris le code postal et le pays</i> ) <b>Laboratorium voor Moleculaire Biologie LMBP</b> <b>Universiteit Gent (RUG)</b> <b>K.L. Ledeganckstraat 35 B-9000 Gent</b> <b>Belgique</b>	
Date du dépôt <b>19 décembre 2001</b>	n° d'ordre <b>LMBP 5830CB</b>
C. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES ( <i>le cas échéant</i> ) <span style="float: right;">Une feuille supplémentaire est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/></span>	
D. ÉTATS DÉSIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES ( <i>si les indications ne sont pas données pour tous les États désignés</i> )	
E. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT ( <i>le cas échéant</i> )	
Les indications énumérées ci-après seront fournies ultérieurement au Bureau international ( <i>spécifier la nature générale des indications p. ex., "n° d'ordre du dépôt"</i> )	

Réservé à l'office récepteur	
<input type="checkbox"/>	Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale
Fonctionnaire autorisé	

Réservé au Bureau international	
<input type="checkbox"/>	Cette feuille est parvenue au Bureau international le :
Fonctionnaire autorisé	

Référence du dossier du déposant ou du mandataire	ULB 2	Demande internationale	PCT/EP 01 / 15279
---	-------	------------------------	-------------------

**INDICATIONS RELATIVES À UN MICRO-ORGANISME OU  
AUTRE MATÉRIEL BIOLOGIQUE DÉPOSÉ**

(règle 13bis du PCT)

A. Les indications ont trait au micro-organisme ou autre matériel biologique visé dans la description page <u>16</u> , ligne <u>8</u>	
B. IDENTIFICATION DU DÉPÔT <span style="float: right;">D'autres dépôts font l'objet d'une feuille supplémentaire <input checked="" type="checkbox"/></span>	
Nom de l'institution de dépôt <b>BCCM - LMBP</b> <b>Belgian Coordinated Collections of Microorganisms</b>	
Adresse de l'institution de dépôt ( <i>y compris le code postal et le pays</i> ) <b>Laboratorium voor Moleculaire Biologie LMBP</b> <b>Universiteit Gent (RUG)</b> <b>K.L. Ledeganckstraat 35 B-9000 Gent</b> <b>Belgique</b>	
Date du dépôt <b>19 décembre 2001</b>	n° d'ordre <b>LMBP 5831 CB</b>
C. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES ( <i>le cas échéant</i> ) <span style="float: right;">Une feuille supplémentaire est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/></span>	
D. ÉTATS DÉSIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES ( <i>si les indications ne sont pas données pour tous les États désignés</i> )	
E. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT ( <i>le cas échéant</i> )	
Les indications énumérées ci-après seront fournies ultérieurement au Bureau international ( <i>spécifier la nature générale des indications p. ex., "n° d'ordre du dépôt"</i> )	
<p align="center">Réservé à l'office récepteur</p> <p><input type="checkbox"/> Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale</p> <p>Fonctionnaire autorisé</p>	<p align="center">Réservé au Bureau international</p> <p><input type="checkbox"/> Cette feuille est parvenue au Bureau international le :</p> <p>Fonctionnaire autorisé</p>

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**